

精子の電子顕微鏡的観察のための Agar 包埋法

小 山 久 一*・平 尾 和 義*

(家畜繁殖学研究室)

Preparation of Spermatozoa by Agar Method for Electron Microscopy

Hisaichi KOYAMA*・Kazuyoshi HIRAO*

(April, 1977)

電子顕微鏡で、家畜精子の微細構造を比較観察する場合の試料作製法は、精子を固定時に遠沈し軟ペレット状（略、遠沈ペレット法）にするか、あるいは口紙上に吸着、凝集させる方法（略、口紙法）などが用いられてきた^{1~5,10,12,13}。これらの方法は簡便で精子を容易に濃縮し、凝集塊をつくることはできるが、多数の精子に一定の方向性をもたせる場合にはやや難点があった。いっぽう、Jones^{7,8,9}はスイング式遠心機で、精子を Agar 溶液中に遠沈包埋して試料を作製（略、Agar 包埋法）したところ、多数の同一方向性のある精子を得、特定部位の形態の比較観察が容易であると述べている。

著者らは、牛精子試料作製法として Agar 包埋法にアルグル式遠心機を応用する方法を試み、包埋時における遠心速度および精子数など 2, 3 の要因を検討し、従来実施されてきたペレット法と比較し次の結果を得た。

供試材料および実験方法

1 供試材料

北海道家畜改良事業団人工授精所繋養のホルスタイン種より人工陰法により採取した。精液は採取後直ちに 30°C に保温し、30 分経過したものを供試した。精液性状は精液量 90 ml, 精子数 90×10^7 /ml, 最活発前進精子 85% であった。

2 試料作製法

(1) 固定法：30°C 保温精液 0.2 ml を、Ito & Karnovsky⁶ のカコジル酸緩衝液で pH 7.4 に調整した、2.5% ホルムアルデヒド、2.5% グルタルアルデヒド溶液 6 ml 中に入れ、30°C、20 分間固定した。次に、5°C に冷却した 1% 四酸化オスミウム緩衝液中で 30 分間、後固定を行ない、室温で 1500 r.p.m., 20 分間遠沈し、精液量を約 0.3 ml に濃縮後、Fig. 1

* Lab. of Animal Reproduction, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido, Japan.

に示した器具で Agar 中に包埋した。

(2) Agar 包埋法：包埋器具は 1.0 ml プラスチック注射器の外筒を用い、内筒の先にプランジャーをつけて、その中央に挿入し、外側は発泡スチロール筒を保温の目的で装着した。Agar 包埋はプランジャーの上部に約 0.3 ml の濃縮固定精子を注入、温湯 (60°C) で約 1 分間加温後、予め 60°C 加温した 2 % Agar—300 mM サッカロース溶液 0.05 ml を静かに加えた。ついで、容器を発泡スチロール筒で保温しながら 2500~3000 r.p.m., 10 分間遠沈後、5°C の冷水中で Agar を固化させた。十分に固化した Agar を容器より押し出し、精子を包埋した部分 (黒色) を、大きさ $1 \times 1 \times 3$ mm のブロック状に細切、常法のごとく、30~100% エタノールで各々 30 分間脱水、プロピレンオキシド処理、ラバーベツトで、薄切面がブロックの長軸に位置するように調整しながらエボン 812 に包埋、60°C で 48 時間重合した。

(3) ベレツト法：無希釈精液 (精子数, $90 \times 10^7/\text{ml}$) 1.0 ml を 2500 r.p.m., 10 分間遠沈後、軟ベレツト化した精子の一部をスポイトで取出し、Agar 包埋法と同様に固定、脱水およびプロピレンオキシド処理を行ない、ゼラチンカプセルでエボン 812 に包埋した。

(4) 薄切・観察要領：Porter—Blum MT—1 型超ミクロトームで超薄切片を作製、酢酸ウラニル溶液とクエン酸鉛溶液で二重電子染色をした。日立 HS—8 型電子顕微鏡を用い、加速電圧 50 kv, 直接倍率 6900 倍で撮影、プリント引伸し 2.5 倍で観察した。

なお、試料中の精子の方向性は、約 $1 \sim 2 \mu$ の切片をトルイジンブルー染色、光学顕微鏡倍率 600 倍で観察した。

3 実験条件

Agar 包埋では、精液中の精子数と精子濃縮時の遠心速度が精子の Agar 包埋状態に影響すると推察されたので、つぎの条件を設けた。

(1) 精液の希釈：精液材料中の精子数を $5 \times 10^7/\text{ml}$, $10 \times 10^7/\text{ml}$, $20 \times 10^7/\text{ml}$ および $90 \times 10^7/\text{ml}$ (無希釈) とした。

(2) 遠心速度：希釈材料を 2500 r.p.m., 3000 r.p.m. および 3500 r.p.m., 各 10 分間遠心した。遠心機はクボタ KC-20 型のアングル方式を使用した。

結 果

1 精子数と Agar 包埋状態

精子数を $5 \times 10^7/\text{ml}$, $10 \times 10^7/\text{ml}$, $20 \times 10^7/\text{ml}$ および $90 \times 10^7/\text{ml}$ に調製し、固化 Agar 中の精子包埋状態を検討した結果を、Fig. 2~5 に示した。すなわち、精子数 $5 \times 10^7/\text{ml}$ および $10 \times 10^7/\text{ml}$ では精子が Agar 中にほぼ完全に埋没し、重力の加わった方向に沈澱、

濃縮されていた。しかしながら、精子数 $20 \times 10^7/\text{ml}$ では精子の濃縮した黒色部は完全に包埋できず、軽く触れると、その一部が塊状をなして、Agar 底側部より剥離した。精子数 $90 \times 10^7/\text{ml}$ では、 5°C に冷却、Agar 固化後容器に押し出す時、すでに濃縮精子は Agar より分離し、ほとんど包埋されなかった。

Agar 包埋は精子数が $5 \times 10^7/\text{ml}$ および $10 \times 10^7/\text{ml}$ のとき概ね良好で、精子数が多くなるに従い濃縮状態が不安定となり、固定精子の一部または全体が Agar より分離するのが認められた。

2 遠心速度と Agar 包埋状態

結果は Fig. 6～8 に示した通りで、精子数の場合と同じく遠心速度が Agar 包埋状態に影響を及ぼした。すなわち、3500 r.p.m, 10 分間で濃縮精子が固化 Agar より分離し、精子数 $90 \times 10^7/\text{ml}$ の場合とほぼ同じ状態であった。Agar 包埋法は遠心速度が低くなるに従い良好な傾向がみられ、濃縮精子の分離も認められず、3000 r.p.m, 10 分間で最も良好な包埋状態を得た。3000 r.p.m 以下でも固定精子は、Agar 中に包埋されるが濃縮程度がやや弱く Agar 底側部の精子は少なく中位から上部にかけて散在しているのが認められた。

3 試料中の精子の方向性

光学顕微鏡で Agar 包埋精子の方向性をしらべた結果は Fig. 9, 10 に示した通りで、精子数 $5 \times 10^7/\text{ml}$ および $10 \times 10^7/\text{ml}$ の場合は同程度に精子が集積し、その切断面の多くに同一方向性がみられた。一方、電子顕微鏡では精子頭部の縦断像、または横断像がみられた (Fig. 13)。

ペレット法では Fig. 11, 12 に示したように、精子は同一方向性のある頭部縦断像や横断像のみられる部位と、平面像や傾斜断面像がみられる部位とが混在していた。

考 察

家畜精子の電子顕微鏡試料作製には、種々の方法が試みられてきたが¹⁻¹³⁾、試料中の精子の濃縮、凝集には一般に遠沈によるペレット法が用いられている。ペレット法は簡便で、容易に試料中の精子を濃縮できる利点があるが、固定処理までに時間を必要とする²⁾。また、試料作製過程で固定および脱水に際し、凝集した精子が崩壊し拡散が起ることが多い。このようなことは精子の微細構造を観察する場合不適当と思われる。

濃縮凝集精子の崩壊を避ける方法には、ペレット化した精子の一部を Agar 中に一時包埋したまま固定および脱水処理を行ない、樹脂に包埋する際に精子のみ取り出す方法^{3,4,13)}と精子を口紙上に吸着させ、口紙ごと固定、脱水および樹脂包埋する方法とが用いられている^{1,2,4)}。これらの方法では、いずれも精子の固定前の処理に時間がかかることや、多量の

精液を必要とするなどの欠点がある。また、超薄切の際、頻繁にガラスナイフを交換しなければならないという頻雑さも指摘されている²⁾。

Agar 包埋法は、固定後の精子を Agar 中に包埋するので、材料採取から固定処理までの時間を短縮することができ、さらに Agar に包埋するため脱水からの過程も固定精子に触れることなく、円滑に実施できた。また、薄切面の確認もきわめて容易で、固定精子を通常の組織試料作製と同じ取扱いで処理できた。

試料中の精子の方向性は、精子数 $5 \times 10^7/\text{ml}$ と $10 \times 10^7/\text{ml}$ 、遠心 3000 r.p.m, 10 分間で最も良好な状態が得られた。アングル式遠心機では重力が包埋容器に対し傾斜角の状態に加わり、Agar 単位体積当りの濃縮凝集する精子が極端に多くなった。しかし、これは包埋容器の体積を変えることにより調整できるものと思われる。

これらのことから精子の微細構造の変化を電子顕微鏡で観察する際の試料作製法にこのアングル式遠心機を用いた Agar 包埋法は十分活用できうるものと考えられる。

要 約

牛精子の電子顕微鏡試料作製法としてアングル式遠心機を用いて Agar 包埋法を試み、遠心速度および精子数が包埋状態におよぼす影響を検討した。その結果、精子数 $10 \times 10^7/\text{ml}$ 、遠心速度 3000 r.p.m, 10 分間でもっとも良好な精子の濃縮と包埋状態を得ることができた。また、このようにして包埋した精子はペレット法に比し、一定の方向性を示し、精子頭部では縦断像を呈すものが多く観察された。

稿を終るに当り御校閲を賜った酪農学園大学家畜解剖学研究室、阿部光雄教授に深謝の意を表する。

引用文献

- 1) Bane, A. and L. Nicander, 1966 Electron and light microscopical studies on spermateliosis in a boar with acrosome abnormalities. *J. Reprod. Fert.*, **11** : 133-138.
- 2) Birch-Andersen, A., 1963 Concentrating ejaculated sperm for electron microscopy. *Nature.*, **13** : 201-203.
- 3) Blom, E. and A. Birch-Andersen, 1960 The ultrastructure of the bull sperm. I. The middle piece. *Nord. Vet. Med.*, **12** : 261-279.
- 4) Blom, E. and A. Birch-Andersen, 1965 The ultrastructure of the bull sperm. II. The sperm head. *Nord. Vet. Med.*, **17** : 193-212.
- 5) Healy, P., 1969 Effect of freezing on the ultrastructure of the spermatozoon of some domestic animals. *J. Reprod. Fert.*, **18** : 21-27.
- 6) Ito, S. and J. Karnovsky, 1968 Formaldehyde-Glutaraldehyde fixatives containing trinitro com-

- pounds. *J. Cell. Biol.*, **39** : 168a.
- 7) Jones, R. C., 1973 The plasma membrane of ram, boar and bull spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, **33** : 179–183.
 - 8) Jones, R. C., 1973 Preparation of spermatozoa for electron and light microscopy. *J. Reprod. Fert.*, **33** : 145–149.
 - 9) Jones, R. C. and I. C. A. Martin, 1973 The effects of dilution, egg yolk and cooling to 5°C on the ultrastructure of ram spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, **35** : 311–320.
 - 10) McCosker, P. J., 1969 Abnormal spermatozoan chromatin in infertile bulls. *J. Reprod. Fert.*, **18** : 363–365.
 - 11) Nath, J., 1972 Correlative biochemical and ultrastructural studies on the mechanism of freezing damage to ram semen. *Cryobiology.*, **9** : 240–246.
 - 12) Saacke, R. G. and J. O. Almgvist, 1964 Ultrastructure of bovine spermatozoa. I. The head of normal, ejaculated sperm. *Am. J. Anat.*, **115** : 143–162.
 - 13) Saacke, R. G. and G. E. Marshall, 1968 Observations on the acrosomal cap of fixed and unfixed bovine spermatozoa. *J. Reprod. Fert.*, **16** : 511–514.

Summary

In order to concentrate numerous sperm cells in a single field for electron microscopy, bull spermatozoa were concentrated in agar (agar method) by angle-type centrifuge. This method is as follows: the cells were fixed in buffered glutaraldehyde and osmium tetroxide, concentrated and supported in agar by centrifugation for 10 min. at 2500–3500 r.p.m. The sperm concentrations of $5 \times 10^7/\text{ml}$, $10 \times 10^7/\text{ml}$ and $90 \times 10^7/\text{ml}$ were dehydrated with ethyl alcohol and embedded in Epon 812. The apparatus used in the agar method was prepared from a 1 ml plastic syringe (Fig. 1).

The embedding condition of the cells in agar was affected by the centrifugal speed and sperm concentration. In samples of more than $20 \times 10^7/\text{ml}$ spermatozoa at 3500 r.p.m. the centrifugal force resulted in a detachment of the condensed part of cells from solid agar. The optimum condition was centrifugation at 3000 r.p.m. for 10 min. with $5 \times 10^7/\text{ml}$, $10 \times 10^7/\text{ml}$ spermatozoa.

As a result of the above preparations excellent orientation of sperms under light micrograph was seen and longitudinal sections of the head portion was obtained under electron microscopy.

The agar method in which an angle-type centrifuge was used was found to suitable for preparation of bull spermatozoa for electron microscopy.

Explanation of plates

Fig. 1. Apparatus for concentrating fixed spermatozoa into agar : A. centrifuge tube ; B. barrel of warm keeping ; C. piston of syringe; D. syringe piston with rubber plunger removed ; E. barrel of syringe.

Fig. 2~8. Concentrated spermatozoa in solid agar (forming dark region) .

Fig. 2. Agar cylinder containing 5×10^7 /ml spermatozoa.

Fig. 3. Agar cylinder containing 10×10^7 /ml spermatozoa.

Fig. 4. Agar cylinder containing 20×10^7 /ml spermatozoa.

Fig. 5. Agar cylinder containing 90×10^7 /ml spermatozoa.

Fig. 6. Agar cylinder centrifuged at 2500 r.p.m.

Fig. 7. Agar cylinder centrifuged at 3000 r.p.m.

Fig. 8. Agar cylinder centrifuged at 3500 r.p.m.

Fig. 9~12. Light micrographs of $1 \sim 2 \mu$ section showing the concentration and orientation of spermatozoa $\times 1120$.

Fig. 9. Agar method, 5×10^7 /ml spermatozoa.

Fig. 10. Agar method, 10×10^7 /ml spermatozoa.

Fig. 11, 12. Pelleted spermatozoa.

Fig. 13. Electron micrograph of bull spermatozoa : showing longitudinal sections through the head $\times 17250$.



